

基于网络药理学探讨吕仁和“脾瘵降糖方” 在糖尿病前期中的作用机制[※]

倪玉婷¹ 孙素涛² 刘尚建^{3▲} 黄光瑞⁴ 王 婷⁴

摘要 目的:运用网络药理学的分析方法探讨吕仁和教授自拟的脾瘵降糖方在糖尿病前期中的作用靶点和机制。**方法:**筛选脾瘵降糖方中药物的活性成分,检索与成分相关的靶点数据;筛选 2 型糖尿病的相关基因靶点数据;对所筛选得到的靶点数据取其交集,分析得到蛋白质-蛋白质相互作用网络,并进行“脾瘵降糖方-糖尿病-靶点”富集分析,从而得到脾瘵降糖方对 2 型糖尿病调节作用的主要途径。**结果:**脾瘵降糖方主要有效成分为木犀草素、槲皮素、黄芩苷、谷甾醇、草拨宁、栀子黄、甘草素、3'-甲氧基大豆苷元等;脾瘵降糖方治疗 2 型糖尿病的关键靶点为碳酸酐酶 IV、丝苏氨酸激酶、丝裂原活化蛋白激酶、血管内皮生长因子 A、多药耐药性蛋白、碳酸酐酶 II、碳酸酐酶 I 等;脾瘵降糖方通过众多途径(包括:肾上腺素分泌、单萜类、omega-羟化酶、胰岛素分泌、神经活性配体-受体相互作用、HIF-1 信号通路、环腺苷酸信号通路、AMPK 信号通路等)对 2 型糖尿病有调节作用。**结论:**脾瘵降糖方能从多途径对机体进行调节,进而在糖尿病前期就阻断其发展,恢复机体健康。

关键词 吕仁和;脾瘵降糖方;糖尿病前期;网络药理学

根据《中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)》^[1],糖尿病前期亦可被称之为糖代谢调节受损,包括两方面内容:糖耐量异常、空腹血糖受损。全球范围 2019 年调查显示,在 20~70 岁人群中,糖尿病的发病率达到了 9.3%^[2]。与糖尿病人群数量相比,糖尿病前期的人群数量更为庞大^[3],而糖尿病前期是可以干预并且恢复到健康状态的。

国医大师吕仁和教授主要研究糖尿病及其并发症、慢性肾脏疾病,其师承秦伯未、施今墨、祝谌予等,集众医家之长,临床 60 余年积累了丰富的经验。吕仁和教授从《黄帝内经》立论,主张将消渴病分成脾瘵期、消渴病期和消瘵期,分别对应糖尿病前期、糖尿病期和糖尿病并发症期^[4]。吕仁和教授指出,糖尿病、高尿酸血症、高脂血症等代谢性疾病病前状态均属于“脾瘵”范畴,其核心病机为脾热^[5]。因此在脾瘵期的治疗上,吕仁和教授不仅注重顾护脾胃,还注重滋阴

药物的使用,以防脾热伤津^[6],自拟脾瘵降糖方(药用:黄精 6 g,芦根 10 g,佩兰 6 g,山药 10 g,栀子 3 g,生山楂 5 g),效果明显。现应用网络药理学来评定脾瘵降糖方在糖尿病前期中的作用。

1 资料与方法

1.1 脾瘵降糖方药物活性化学成分的筛选 运用 TCMSp 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 及 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 对脾瘵降糖方复方中的药物活性化学成分进行检索。有效成分筛选条件:口服生物利用度(Oral bioavailability, OB)≥30%,药物相似性(drug-likeness, DL)≥0.18。

1.2 脾瘵降糖方药物靶点的筛选 将上述活性化学成分导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 进行筛选,得到脾瘵降糖方有效成分靶点。将得到的脾瘵降糖方中有效化学成分靶点信息导入 cytoscape 3.8.0 可视化软件,绘制复方成分靶点网络图。

1.3 2 型糖尿病基因靶点筛选 分别从综合性药物数据库 Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) 和人类基因信息网站数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 检索出与 2 型糖尿病相关的基因,合并检索出的相关基因信息。

[※]基金项目 2019 年国家重点研发计划重点专项——中医药现代化研究(No.2019YFC1710101)

▲通信作者 刘尚建,男,主任医师,硕士研究生导师。研究方向:中医药防治肾病与内分泌疾病。E-mail:dzmyylsj@163.com

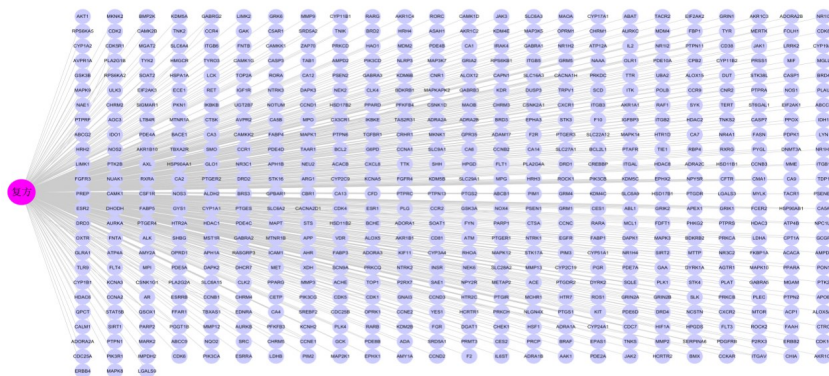
•作者单位 1.北京市宣武中医医院(北京 100050);2.首都医科大学附属北京世纪坛医院(北京 100038);3.北京中医药大学东直门医院(北京 100700);4.北京中医药大学(北京 100029)

1.4 确定脾瘕降糖方与2型糖尿病的靶点交集并构建相互作用网络图 将筛选出的脾瘕降糖方中有效化学成分靶点和2型糖尿病相关的基因靶点数据导入String数据库(https://string-db.org),获得靶点交集,并绘制脾瘕降糖方与2型糖尿病靶点网络交汇图。

1.5 脾瘕降糖方与2型糖尿病靶点通路富集分析并绘制网络图 将脾瘕降糖方治疗2型糖尿病的有效化学成分靶点导入DAVID数据库(https://david.ncifcrf.gov)进行基因富集分析,运算得到蛋白质-蛋白质相互作用网络,将富集分析数据导入微生信网站(https://www.bioinformatics.com.cn/)绘制富集分析可视图。

2 结果

2.1 脾瘕降糖方复方中的药物活性化学成分 通过



圆形“复方”为脾瘕降糖方;中间矩形方阵列出的均为作用靶点

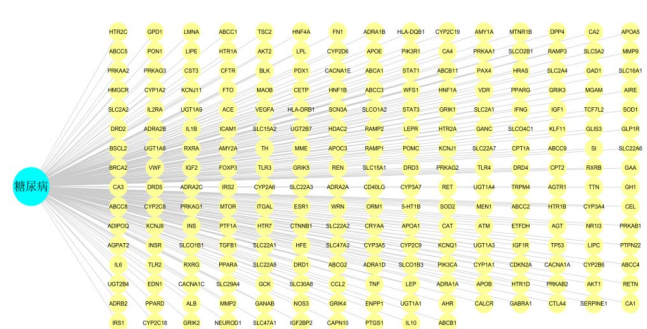
图1 脾瘕降糖方复方作用靶点网络图

2.3 2型糖尿病靶点筛选结果 分别从综合性药物数据库 Drugbank 和人类基因信息网站数据库 GeneCards 导出糖尿病靶点 128 个和 118 个,合并后得到 2 型糖尿病靶点 235 个。包括:麦芽糖酶糖化酶(MGAM)、酸性葡糖苷酶 A(GAA)、人胰α淀粉酶(AMY2A)、胰高血糖素样肽 1 受体(GLP1R)、3-甲基戊二酰辅酶(hmger)、细胞色素 P4503A4 酶(CYP3A4)等。见图2。

2.4 脾瘕降糖方靶点与2型糖尿病靶点蛋白质相互作用网络 将脾瘕降糖方靶点与2型糖尿病靶点取交集,得到靶点 72 个,包括:碳酸酐酶IV(CA4)、丝苏氨酸激酶(AKT1)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、多药耐药性蛋白(ABCB1)、碳酸酐酶 II(CA2)、碳酸酐酶 I(CA1)、乳腺癌耐药蛋白(ABCG2)、雌激素受体基因(ESR1)、唾液淀粉酶 A1(AMY1A)、药物转运蛋白 ABCC1 等,见表1。导入String数据库,得到蛋白的相互作用网络图,见图3。

检索TCMSP数据库及HERB数据库得到药物有效成分,包括:木犀草素(luteolin)、槲皮素(querctetin)、黄芩苷(baicalein)、谷甾醇(sitosterol)、萜拨宁(piperlonguminine)、栀子黄(crocin)、甘草素(dfv)、3'-甲氧基大豆苷元(3'-methoxydaidzein)等。

2.2 脾瘕降糖方复方作用靶点及网络图 通过检索SwissTargetPrediction数据库得到复方靶点641个,如:组蛋白去甲基化酶(KDM4E)、牛黄嘌呤脱氢酶(XDH)、花生四烯酸-15-脂加氧酶(alox15)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)、花生四烯酸-12-脂加氧酶(ALOX12)、G蛋白偶联受体激酶6(GRK6)、P450芳香酶(CYP19a1)等。导入cytoscape 3.8.0可视化软件,绘制脾瘕降糖方成分靶点网络图,见图1。



中间矩形方阵列出的均为2型糖尿病靶点

图2 2型糖尿病靶点图

2.5 基因富集分析结果 GO通路富集分析显示,脾瘕降糖方在组胺、肾上腺素分泌、单萜类、多巴胺、omega-羟化酶、血管收缩、环氧基酶、类固醇、胰岛素分泌、环氧基酶P450通路等众多途径对2型糖尿病有调节作用。见图4。

KEGG通路富集分析显示脾瘕降糖方在神经活性

表1 脾瘵降糖方靶点与2型糖尿病共同靶点

序号	靶点名称	序号	靶点名称	序号	靶点名称	序号	靶点名称
1	CA4	19	PPARG	37	HTR2C	55	CPT1A
2	ABCB1	20	APOB	38	PTGS1	56	GRIK1
3	CA2	21	MTNR1B	39	PON1	57	GRIK2
4	CA1	22	GCK	40	HMGCR	58	ADRA2A
5	ABCG2	23	HDAC2	41	CYP2C19	59	ADRA2B
6	ESR1	24	DRD3	42	NR1H3	60	ADRA1A
7	AMY1A	25	MTOR	43	VDR	61	DRD1
8	ABCC1	26	CETP	44	PPARD	62	NOS3
9	CFTR	27	PIK3CA	45	UGT2B7	63	RXRA
10	MMP9	28	AGTR1	46	DRD2	64	RXRG
11	MMP2	29	ABCC9	47	RET	65	ATM
12	AHR	30	HTR1D	48	CYP2C9	66	AMY2A
13	CYP1A1	31	ADRA2C	49	CYP3A4	67	GAA
14	INSR	32	ADRA1B	50	CYP1A2	68	SLC5A2
15	IGF1R	33	HTR7	51	DRD4	69	SERPINE1
16	PPARA	34	GABRA1	52	PIK3R1	70	HNF4A
17	MAOB	35	ACE	53	CA3	71	VEGFA
18	MGAM	36	MME	54	AKT1	72	AGPAT2

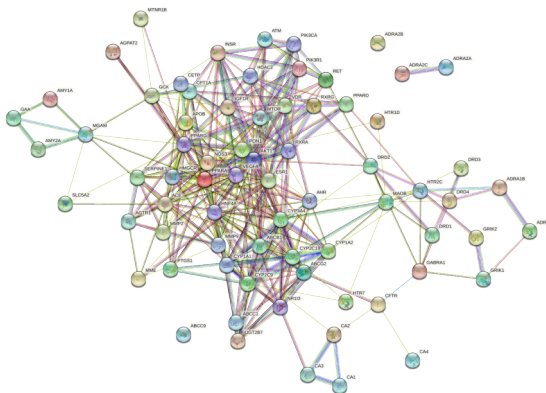


图3 脾瘵降糖方与2型糖尿病靶点相互作用网络图

配体-受体相互作用、HIF-1信号通路、环腺苷酸信号通路、AMPK信号通路、淀粉和蔗糖代谢、碳水化合物代谢吸收、亚油酸消化代谢、脂肪细胞的代谢分解、胆汁的分泌、胰岛素(Ins)抵抗、雌激素信号通路、甲状腺激素信号通路等众多途径对2型糖尿病有调节作用。见图5。

3 讨论

“脾瘵”一词出自《黄帝内经》，原文曰：“帝曰：病有口甘者……此五气之溢也，名为脾瘵。”脾在中医学中被认为是气血生化之源、后天之本。脾受损伤之后，失其健运，导致完谷不化，进而导致人体气机失常，从而湿浊内生，久而化热转成湿热内蕴，遂发展成

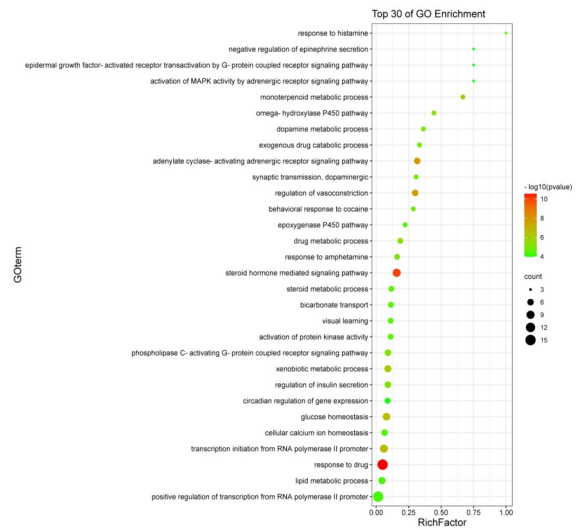


图4 GO通路富集分析

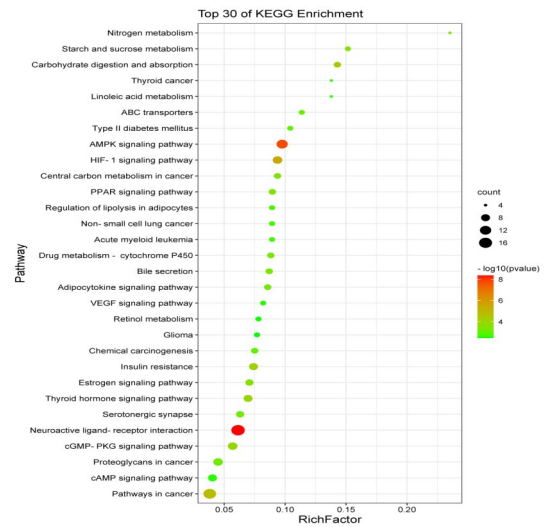


图5 KEGG通路富集分析

血糖尿糖升高，最终发病成为“脾瘵”^[7]。

《素问·五常政大论》：“火曰升明，土曰备化。”土称为“备化”，具备着生化万物之气，使万物具备形体。糖尿病的整个发展过程中，脾从正常生理状态的备化，逐渐发展到备化过盛的状态“脾瘵”，进一步到备少化多的状态，也就是消渴，再最终到无备无化状态，即五脏皆柔弱的“消瘵”^[8]。吕仁和教授根据《黄帝内经》论述及其六十余年的临床经验，将消渴病分为三期^[9]：脾瘵期、消渴期及消瘵期，并可与现代中医学消渴病的三期（即消渴病前期、消渴病期及消渴病并发症期）分别对应，用来指导临床，在预防和治疗糖尿病整个发展过程方面，均取得了较为满意的效果。从“脾瘵”的角度来考虑代谢性疾病的疾病前期状态，可为预防和治疗代谢性疾病提供中医理论依据，从而阻止其进一步发展成疾病状态，如糖尿病等^[10]。

中药复方本身就是多作用成分、靶点及途径的极其复杂综合体。而网络药理学因其具有整体性、系统性, 以及其注重药物间相互作用的特点, 与中药复方的基本特点吻合, 可从系统综合层面反映中药复方对人体的调控作用, 为研究传统中药复方与现代药理学之间的相互关联搭建沟通的桥梁。网络药理学可以提示中药复方整体及各成分与作用靶点之间的相互关联, 也可以描述中药有效成分之间的相互协同作用, 从而展示中药复方的药效微观生物学基础, 可以为优化或者是评价已知中药复方的临床效果提供有力的理论依据^[11]。

研究显示, 脾瘵降糖方中的有效成分有: 木犀草素、槲皮素、黄芩苷、谷甾醇、萜拨宁、栀子黄等。槲皮素、木犀草素、谷甾醇都是黄酮类化合物, 可通过清除自由基、减轻脂质过氧化、抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性、调节糖脂代谢等途径, 调节相关基因蛋白表达, 提高胰岛素敏感性, 改善胰岛素抵抗^[12]。栀子黄对 α -葡萄糖具有抑制作用, 可减少碳水化合物向葡萄糖转化, 同时减少小肠对糖类物质的吸收, 从而降低血糖^[13]。本研究通过用网络药理学来验证吕仁和经验方脾瘵降糖方的作用, 结果表明, 糖尿病基因靶点与脾瘵降糖方药物靶点交集密切, 共同靶点有72个, 关键靶点为碳酸酐酶(CA)、丝苏氨酸激酶(AKT1)等。CA广泛分布于动物、植物及微生物中, 作用广泛, 具有超高催化效率, 抑制CA能有效降低糖化血红蛋白(HbA1c); AKT1作为AKT的一种亚型在人体中作用广泛, 可介导葡萄糖的摄取和调节, 直接抑制FoxO1, 而降低体内葡萄糖水平; VEGFA可诱导血管通透性增加并抑制细胞凋亡。基因富集分析显示, 脾瘵降糖方可以通过众多途径对血糖进行调节, 如: HIF-1信号通路、环腺苷酸信号通路、神经活性配体-受体相互作用、AMPK信号通路、甲状腺激素信号通路、肾上腺素分泌等。HIF-1信号通路可使脂肪细胞呼吸变得不耦合, 导致氧气消耗增加, 脂肪组织局部缺氧并释放炎症因子, 激活HIF-1 α 的产生, 诱导p53蛋白的积累, 导致肝脏脂肪变性, 肝细胞凋亡和肝脏胰岛素信号通路减少, 产生胰岛素抵抗; AMPK信号通路的主要功能是维持细胞能量平衡, 调节葡萄糖和脂肪酸代谢, AMPK活化能够刺激葡萄糖的摄入和运输, 促进葡萄糖的利用, 同时在缺乏能量供应时, AMPK能够促进脂肪酸的氧化, 以维持细胞能量平衡, AMPK的活化可能对糖尿病、肥胖等疾病具有重要的潜在治疗作用; 甲状腺激素参与葡萄糖代谢, 促进小肠黏膜对葡萄糖的吸收, 同时能促

使肝糖原分解, 也能促进外周组织对糖分的利用, 并导致血糖升高; 肾上腺素属于升糖激素, 可以抵抗胰岛素的敏感性, 削弱胰岛素的降糖能力, 而使血糖升高。

国医大师吕仁和教授从《黄帝内经》立论, 集众家之所共知和多年临床经验, 总结出糖尿病前期经验方脾瘵降糖方, 经过网络药理学基因富集分析, 显示该方能从HIF-1信号通路、环腺苷酸信号通路、神经活性配体-受体相互作用、AMPK信号通路、调节淀粉和蔗糖代谢、碳水化合物消化吸收、调节脂肪细胞的脂分解、胆汁分泌、胰岛素抵抗等众多途径对机体进行调节, 对机体的紊乱状态进行干预, 进而在糖尿病前期就阻断其发展, 恢复机体健康。对于糖尿病前期, 临床治疗中可以吕仁和教授“脾瘵”理论为指导, 立足疾病发生、发展的病势、病位和病理产物, 依据脏腑辨证、气血津液辨证、八纲辨证等, 对脾瘵降糖方进行随证加减, 充分发挥中药复方的组方优势, 展开个体化的治疗, 从而逆转糖尿病前期, 恢复机体健康^[14]。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37(4):311-398.
- [2] 糖尿病肾病多学科诊治与管理共识专家组, 姜世敏, 方锦颖. 糖尿病肾病多学科诊治与管理专家共识[J]. 全科医学临床与教育, 2020, 18(6):484-487.
- [3] SHI Z. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(25):2425-2426.
- [4] 吕仁和. 消渴病(糖尿病)的分期[J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(2):18-19.
- [5] 杨俏丽, 刘尚建, 荆 鲁, 等. 国医大师吕仁和从脾瘵认识代谢性疾病病前状态病机[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10):87-90.
- [6] 龙泓竹, 田文杨, 杨晓晖. 吕仁和教授分期诊治消渴病探源[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(6):508-510.
- [7] 艾 雪, 王 东. 从湿热论治糖调节受损[J]. 中医临床杂志, 2017, 29(10):1650-1652.
- [8] 李金垚, 刘尚建, 荆 鲁, 等. 国医大师吕仁和从“脾常虚化”认识糖尿病发病机制[J]. 中医学报, 2021, 36(8):1679-1682.
- [9] 吕仁和, 张法荣, 高彦彬. 消渴病(糖尿病)中医分期辨证与疗效评定标准[J]. 中国医药学报, 1993, 8(3):54-56.
- [10] 杨俏丽, 刘尚建, 荆 鲁, 等. 国医大师吕仁和从脾瘵认识代谢性疾病病前状态病机[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10):87-90.
- [11] 解 静, 高 杉, 李 琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10):2257-2265.
- [12] 薛燕芳, 杨丽霞, 范 强, 等. 中药黄酮类化合物抗糖尿病作用机制研究述评[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8):1967-1970.
- [13] 徐常珂, 张成博, 杨金萍, 等. 中药栀子本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16):183-191.
- [14] 刘 妍, 常丽萍, 高怀林. 糖尿病前期的中西医药物治疗研究进展[J]. 天津中医药, 2019, 36(11):1141-1144.

(收稿日期:2021-11-30)

(本文编辑:黄明愉)